

ラット骨格筋の神経筋伝達機能に及ぼす筋伸張の影響

片 平 弦一郎

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 石井清一 教授)

太 田 勲

札幌医科大学生理学第1講座 (主任 藪 英世 教授)

Effect of Muscle Stretch on Neuromuscular Transmission in the Rat Skeletal Muscle

Genichirou KATAHIRA

Department of Orthopedic Surgery, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. S. Ishii)

Isao OOTA

Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. H. Yabu)

In order to clarify how neuromuscular transmission was influenced by the extent and period of muscle stretch, the mean quantum content (m) and the frequency of miniature end-plate potential (m. e. p. p.), which are the indexes of presynaptic activity, were examined by using a tibial nerve-soleus muscle preparation of the rat. The results are summarized as the following:

1. In the 5% stretched group, muscle stretch did not influence m and frequency of m. e. p. p. significantly.
2. In the 10% stretched group, muscle stretch did not influence m and frequency of m. e. p. p. significantly at the 14th day after the operation. At the 28th day after the operation, there was a tendency for m to decrease, while frequency of m. e. p. p. was not significantly influenced.
3. In the 20% stretched group, m and frequency of m. e. p. p. were influenced variably in response to the period of muscle stretch. Mean quantum content increased significantly from 4 to 14 days after the operation and thereafter tended to decrease gradually. Frequency of m. e. p. p. at the 4th day after the operation increased significantly as did m, but this increase was prolonged for a longer period than m.
4. The incidence of complex e. p. p. in stretched preparation of the 20% stretched group was higher than the contralateral control preparation.
5. Nerve sprouting was found histochemically in the stretched preparation of the 20% stretched group.

On the basis of these results, we discussed the reasons for change in presynaptic activity which was influenced by muscle stretch. (Received July 24, 1984 and accepted September 25, 1984)

Key words: Neuromuscular junction, Muscle stretch, Mean quantum content, Miniature end-plate potential frequency, Rat tibial nerve-soleus muscle preparation

1 緒 言

整形外科領域における手術あるいは牽引療法などの際に、四肢筋は持続的に伸張されることがしばしばあ

る。筋に加わる伸張がその筋の神経筋伝達機能にいか
なる影響をおよぼすかについては、多くの場合両生類
について研究されてきた¹⁻⁴⁾。その上、これらの研究の
多くは、筋を一時的に伸張したときの神経筋伝達機能

について検討したものである。一方、哺乳動物ではラットの横隔膜筋について、シナプス前側の活動性の指標である平均素量(mean quantum content, m)および微小終板電位(miniature end-plate potential, m. e. p. p.)の頻度に対する一時的な筋伸張の影響が報告されている³⁾。しかし、四肢筋について、しかもこれらの筋の持続的な伸張がシナプス前側の活動性に対していかなる影響をおよぼすかについては、ほとんど研究されていない。

本研究では、哺乳動物の四肢筋の神経筋伝達機能に対する持続的な筋伸張の影響を明らかにするために、筋に持続的な伸張を与えたラットから摘出した脛骨神経-ヒラメ筋標本を用いて、mならびにm. e. p. p.の頻度に対する筋伸張の程度と伸張期間の影響を電気生理学的に検討し、さらに伸張側標本の神経筋接合部を組織化学的に観察した。

2 実験方法

2.1 標本の作製

実験には、雄のウィスター系成熟ラットを65匹使用した。

筋伸張は、下肢に脚延長術を施行することにより行った。脚延長手術手技は、河邨式脚延長術式⁹⁾に準じ以下のようになされた。ラット(体重200-250 g)の腹腔内にsodium pentobarbital (50 mg/kg body weight)を投与し、麻酔した。左後肢をイソジン液で消毒し、田島式K-wire(直径0.8 mm)を脛骨に刺入し、ラット用の脚延長器(Fig. 1)を経皮的に取り付けた。その後、下腿前面の皮膚を切開し、同部分の下腿骨の骨切り術(osteotomy)を行った。皮膚縫合の後、下腿骨を一気に種々の程度に延長した。

延長の程度は、術前の下腿骨長の5%、10%および20%とし、それぞれを便宜的に5%、10%および20%伸張群とした。また、手術自体の影響は、osteotomyのみを施行し、下腿骨を延長しなかった偽手術(sham operation)群について検討した。抗生物質は、神経筋伝達機能に影響をおよぼすこと⁶⁾が報告されているので、術後は使用しなかった。なお、手術肢に感染、術後骨折などを生じた15匹のラットは、本実験に使用しなかった。

術後一定期間経過したラット(体重約250-350 g)の腹腔内にsodium pentobarbital (50 mg/kg body weight)を投与して再び麻酔した。各々の動物から手術側および対照として対側健常側(対側対照)の脛骨神経-ヒラメ筋標本を修正 Krebs 液中で摘出した。

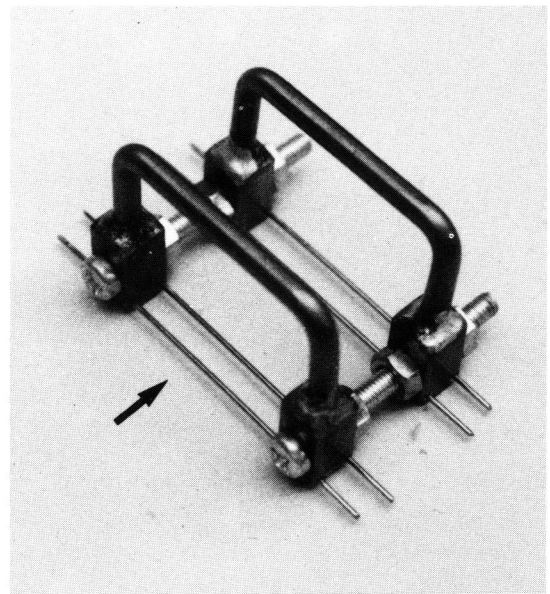


Fig. 1 The distraction apparatus for the left side of the lower leg of the rat. K-wire (ϕ : 0.8 mm, arrow) was inserted into the tibial bone.

2.2 電気生理学的方法

摘出した標本のヒラメ筋は、容量30 mlの容器内にそれぞれの摘出前の筋長で固定した。容器内は、修正 Krebs 液により2-5 ml/minの速度で連続的に灌流した。また、灌流前および灌流中の溶液は、95%O₂-5% CO₂の混合ガスで十分に曝気した。

修正 Krebs 液の組成は、135 mM NaCl, 5 mM KCl, 15 mM NaHCO₃, 1 mM Na₂HPO₄および11 mM glucose (pH 7.2)から成り、これに筋線維の活動電位の発生を抑制するために、そのつど適当濃度のMgCl₂ (10-15 mM)およびCaCl₂ (1.8-2.0 mM)を加えた。なお、同一個体の手術側および対側対照側から摘出した標本に用いる溶液は、同じ組成とし、実験は室温(20-25℃)で行った。

細胞内微小電極法⁷⁾により神経筋接合部位から終板電位(end-plate potential, e. p. p.)および微小終板電位(m. e. p. p.)を記録した。3 M KClを充填した抵抗10-15 M Ω の細胞内微小電極からの電気的信号を、微小電極用増幅器(日本光電工業社製, MEZ-7101)により増幅し、ブラウン管オシロスコープ(日本光電工業社製, VC-9)により観察しつつ連続撮影装置(日本光電工業社製, PC-2B)により記録した。なお、記録は、修正 Krebs 液中に標本を40分間浸漬した後を開始した。

e. p. p.を発生させるために、電気刺激装置(日本光

電工業社製, MSE-3R)を用い, 持続時間0.05 msec, 刺激電圧を最大上刺激とした矩形波パルスを頻度0.8 Hzで, ガラス吸引電極に吸引した脛骨神経に与えた。各々の終板において少なくとも100以上のe.p.p.を連続的に記録し, それらの振幅の平均値を求め, これをその終板における値とした。e.p.p.の振幅は小さかったので, Martinのnon linear summation法⁹⁾による補正は行わなかった。

m.e.p.p.は, これが乱発を起こしていない定常状態において記録した。m.e.p.p.の振幅は, 各々の終板において連続的に発生した60個以上のm.e.p.p.の振幅の平均値を求め, これをその終板における値とした。m.e.p.p.の頻度は, 60秒間に発生するm.e.p.p.の数をもって各々の終板におけるm.e.p.p.の頻度とした。

全ての記録において, 記録中静止膜電位(R.M.P.)が ± 7 mV以上変化した場合, あるいはe.p.p.およびm.e.p.p.の立ち上がり時間が遅い(約1 msec以上)場合は, データから除外した。

平均素量(m)は, 直接法⁹⁾を用いて各々の終板について計算した。各々の標本におけるm, m.e.p.p.の頻度およびR.M.P.の代表値は, 先に求めた各々の終板におけるそれぞれの値を平均することにより求めた。対側対照側と手術側の有意差の検定には, Mann-WhitneyのU-検定法¹⁰⁾を用いた。なお, 全ての記録は, 1標本においてヒラメ筋の外側最表層部で, 少なくとも10カ所以上の神経筋接合部から行った。

2.3 組織化学的方法

神経筋接合部の組織化学的検索は, アセチルコリンエステラーゼの染色にはPestronk and Drachmann¹¹⁾の方法を, 末梢神経軸索の染色にはBodian法¹²⁾を用いて行った。摘出した標本を冷却(-70°C — -80°C)したn-hexane中で急速に凍結し, クライオスタット中で縦断切片(厚さ, 20–30 μm)を作製した。切片は, 反応液中に 37°C 下に10–20分間浸漬した。反応液としては, 0.1 M Tris緩衝液(pH 7.2) 300 ml中に5-bromoindoxyl acetate 0.04 g, 100% ethanol 3 ml, potassium ferrocyanide 0.63 g, potassium ferricyanide 0.5 gおよびcalcium chloride 0.33 gを含む溶液を用いた。次にBodian銀液(1% protein銀液 100 ml中に4 gの銅線を含む)中に 37°C に約12時間浸漬した後, 還元液(1% hydroquinone液 100 ml中に5 mlの中性ホルマリンを含む)で10分間処理した。その後, 1%塩化金酸溶液で5分間, 1%砒酸溶液で2分30秒間, 5%硫酸銅溶液で5分間それぞれ処理し, diatexで封入した後検鏡した。

3 成 績

3.1 電気生理学的観察

mおよびm.e.p.p.の頻度に対する筋伸張の程度と伸張期間の影響を以下の各々の群について検討した。

3.1.1 対 照 群

筋伸張側標本の対照として, 対側標本を用いることの妥当性を検討した(Table 1)。

Table 1 Relative m and relative frequency of m.e.p.p. in the left muscle of normal rats. These values are represented as a fraction of the value in the right muscle.

	relative mean quantum content	relative frequency of m.e.p.p.
1	1.12	0.81
2	1.01	1.07

検討した正常な2個体の, 左側標本のmの値を右側標本のそれに対する相対値として表示すると, 1.12と1.01であり, m.e.p.p.の頻度の相対値は0.81と1.07であった。mおよびm.e.p.p.の頻度は, 両側標本間に有意な差が認められなかった。

以上のように, mおよびm.e.p.p.の頻度に関して, 両側標本間に有意な差が認められなかったので, 対側標本を対照として用いることの妥当性が認められた。したがって, 以下の実験では, 左側下腿筋に伸張をあたえ, 右側の健常脚標本を対側対照として用いた。また, 筋伸張側のmおよびm.e.p.p.の頻度は, 対側対照のそれらに対する相対値として表示した。

3.1.2 偽手術 (sham operation) 群

術後14日目および28日目の個体について, mおよびm.e.p.p.の頻度に対する手術自体の影響を検討した(Fig. 2)。

術後14日目の2個体におけるmの相対値は, いずれも0.85であり, m.e.p.p.の頻度の相対値は, 1.00と0.85であった。術後28日目の2個体におけるmの相対値は, 1.11と1.00であり, m.e.p.p.の頻度の相対値は, 1.01と0.86であった。これらのいずれの値においても, 両側標本間に有意な差が認められなかった。

以上のように, 手術自体はmおよびm.e.p.p.の頻度に対して, 有意な影響をあたえないことが示された。したがって, 以下の各々の伸張群において伸張側標本と対側対照標本との有意差は, 筋伸張そのものによる影響とみなすことができる。

3.1.3 5%伸張群

術後14日目および28日目の個体について, mおよ

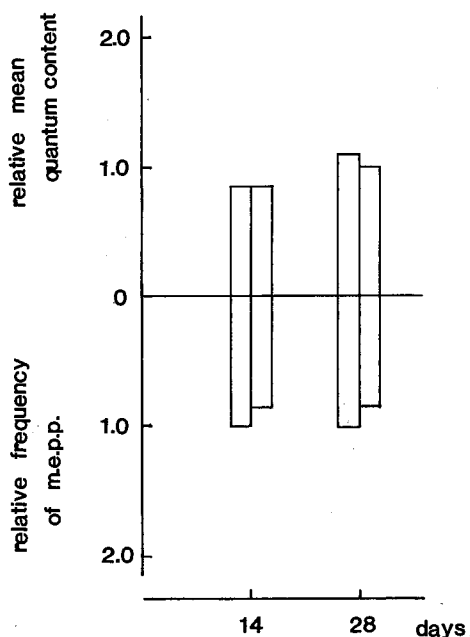


Fig. 2 Effect of sham operation on relative mean quantum content (m) and relative frequency of m. e. p. p. which are expressed as the relative values of the contralateral control. Each bar represents relative m and relative frequency of m. e. p. p. for the animal sacrificed at that time. A pair of upper vertical bar and lower vertical bar indicates that the data is from the same animal. The ordinates indicate the values of relative m and the relative frequency of m. e. p. p.. The abscissa indicates the days after the operation.

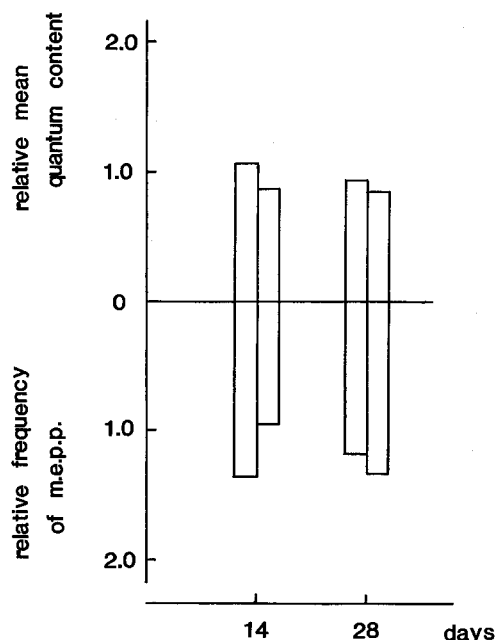


Fig. 3 Effect of muscle stretch on relative m and relative frequency of m. e. p. p. in the 5% stretched group. The ordinates and the abscissa are the same as in Fig. 2.

び m. e. p. p. の頻度に対する筋伸張の影響を検討した (Fig. 3).

術後 14 日目の 2 個体における m の相対値は, 1.06 と 0.88 であり, m. e. p. p. の頻度の相対値は, 1.35 と 0.95 であった. これらの値には, いずれも両側標本間に有意な差が認められなかった. 術後 28 日目の m および m. e. p. p. の頻度の相対値は, それぞれ 0.93 と 0.85 および 1.19 と 1.33 であった. この場合も, 両側標本間に有意な差は認められなかった.

以上のように, 5%伸張群においては, 少なくとも検討した術後 14 日目と 28 日目においては, 筋伸張は m および m. e. p. p. の頻度に対して有意な影響をあたえないことが示された.

3・1・4 10%伸張群

術後 14 日目と 28 日目の個体について, m および m. e. p. p. の頻度を求め, Fig. 4 に示した.

術後 14 日目の 2 個体における m および m. e. p. p. の

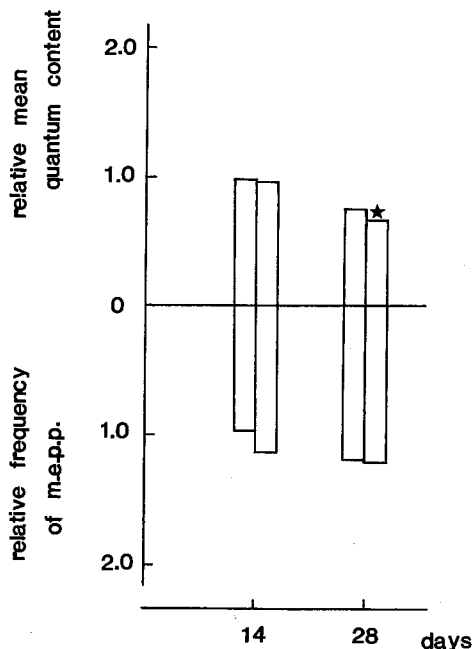


Fig. 4 Effect of muscle stretch on relative m and relative frequency of m. e. p. p. in the 10% stretched group. The ordinates and the abscissa are the same as in Fig. 2.

★ Significantly different from contralateral control value, $P < 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

頻度の対側対照に対する相対値は、それぞれ0.97と0.95および0.97と1.13であった。これらの値には、いずれも両側標本間に有意な差が認められなかった。これに対して、術後28日目の2個体においては、mの相対値は、対側対照の0.74と0.66であった。これらの値は、いずれも対側対照の値に対してやや低下の傾向を示し、ことに1個体においては、5%以下の危険率で有意な低下が認められた。一方、m.e.p.p.の頻度の相対値は、1.19と1.21であり、両側標本間に有意な差が認められなかった。

以上のように、術後14日目では筋伸張はmおよびm.e.p.p.の頻度に対して有意な影響を与えなかった。しかし、術後28日目では筋伸張は、m.e.p.p.の頻度に有意な影響を与えないにもかかわらず、mを低下させる傾向があった。

3.1.5 20%伸張群

術後4日目、7日目、14日目、28日目およびそれ以降の個体についてmおよびm.e.p.p.の頻度を求め、Fig. 5に示した。

mおよびm.e.p.p.の頻度に対して筋の伸張は多様

な影響を与え、しかもそれらは伸張期間に応じて変化した。

術後4日目の3個体におけるmの相対値は、2.46、3.78と1.36であった。m.e.p.p.の頻度の相対値は2.12、1.87と1.59であった。これらの値は、対側対照に比較して、5%以下の危険率でいずれも有意な増加を示した。術後7日目の2個体のうち1個体における、mおよびm.e.p.p.の頻度の相対値は、それぞれ1.69と1.57であった。これらの値も5%以下の危険率で対側対照に比較して、有意な増加を示した。一方、他の1個体のmおよびm.e.p.p.の頻度の相対値は、それぞれ1.40と1.34であり、これらの値には、対側対照との間に有意な差が認められなかった。術後14日目の3個体において、mの相対値は1.31、1.59と1.05であった。これらのうち前2者は、対側対照に比較して有意な増加を示したが、他の1個体では有意な差を認めることができなかった。一方、m.e.p.p.の頻度の相対値は、1.98、1.78と2.00であり、これらはいずれも対側対照に比較して、有意な増加を示した。術後28日目の4個体においては、mの相対値は0.84、0.95、0.88と0.58

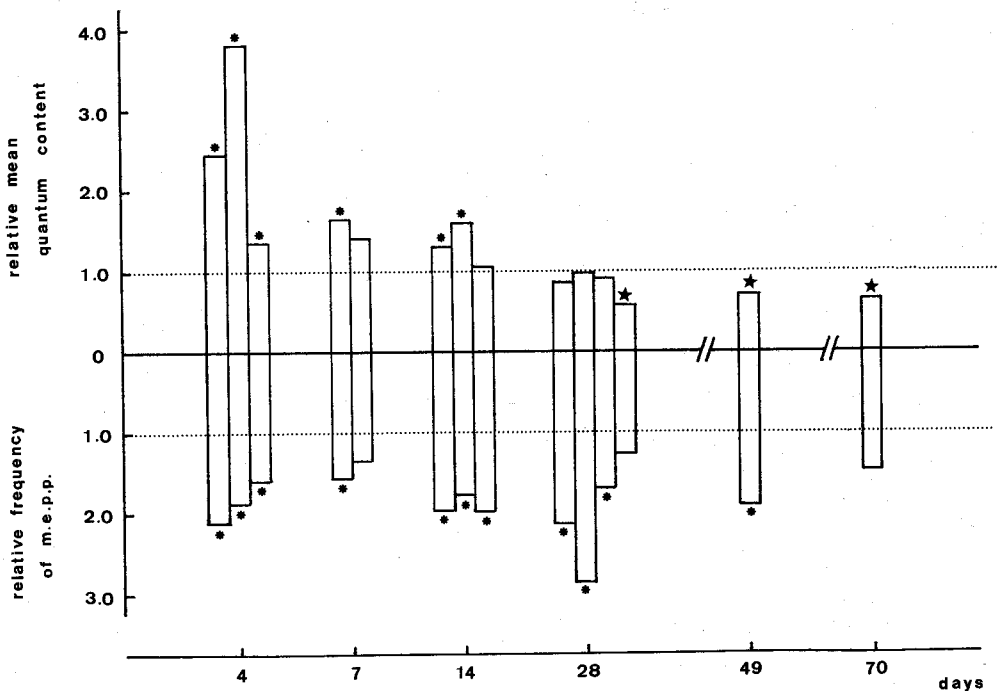


Fig. 5 Effect of muscle stretch on relative m and relative frequency of m.e.p.p. in the 20% stretched group. The ordinates and the abscissa are the same as in Fig. 2. The dotted horizontal lines indicate the control level.

* Significantly different from the contralateral control value, $P < 0.05$ (Mann-Whitney's U-test)
 ★ Significantly different from the contralateral control value, $P < 0.05$ (Mann-Whitney's U-test)

Table 2 Control group indicates a resting membrane potential (R. M. P.) of both soleus muscles. Sham operated, the 5% stretched and 10% stretched group indicate their effect on R. M. P. .
 control : R. M. P. of contralateral control muscle
 ope. : R. M. P. of the muscle in sham operated, the 5% stretched and 10% stretched groups
 The values are expressed as mean \pm S. E. .

	right	left	
control group	65.1±1.1	65.6±0.8	
	65.3±1.0	65.8±1.1	
day after operation (days)		control	ope.
sham operated group	14	68.0±1.2	65.7±1.1
		65.9±0.7	67.3±0.8
	28	66.4±1.2	68.3±0.8
		66.7±0.9	65.2±1.4
5% stretched group	14	70.6±1.7	66.2±0.8
		65.9±1.2	67.4±0.6
	28	65.3±1.3	65.0±1.1
		66.8±1.1	65.4±1.1
10% stretched group	14	65.6±1.3	68.1±0.9
		66.6±0.8	68.3±0.7
	28	65.6±0.9	68.0±0.6
		66.6±0.9	66.5±0.8

であった。これらのうち1個体では、対側対照に比較して有意な低下を示したが、他の3個体では両側標本間に有意な差は認められなかった。m. e. p. p. の頻度の相対値は、2.15, 2.88, 1.70と1.27であった。これらのうち3個体では、対側対照に比較し有意な増加を示したが、他の1個体では両側標本間に有意な差を認めることができなかった。伸張が長期にわたると褥創などの種々の障害が生じたため、術後49日目の1個体、70日目1個体についてのみ検討できた。術後49日目の個体のmおよびm. e. p. p. の頻度の相対値は、それぞれ0.69と1.92であった。mは、対側対照に比し有意な低下を示したが、m. e. p. p. の頻度は、逆に有意な増加を示していた。術後70日を経過した個体では、mの相対値は0.62, m. e. p. p. の頻度の相対値は1.48であった。前者では対側対照に比し、有意な低下が認められたが、後者では有意な差が認められなかった。

以上のように、mは術後4日目では対側対照に比し有意に増加し、この状態は術後14日目まで持続した。その後、mは漸次低下する傾向が認められた。一方、m. e. p. p. の頻度は、mの場合と同様に術後4日目では有意な増加を示した。しかし、増加の状態は、mの場合に比べて長期間持続する傾向が認められた。

なお、以上述べたどの群のどの個体においても静止膜電位は両側標本間に有意な差が認められなかった (Tables 2 and 3).

Table 3 Effect of muscle stretch on resting membrane potential (R. M. P.) in the 20% stretched group.
 control : R. M. P. of contralateral control
 ope. : R. M. P. of the 20% stretched group
 The values are expressed as mean \pm S. E. .

days	control	ope.
4	66.6 \pm 0.6	67.8 \pm 0.7
	66.1 \pm 0.6	67.2 \pm 0.9
	64.8 \pm 0.8	66.9 \pm 0.7
7	67.5 \pm 0.9	64.5 \pm 0.7
	67.4 \pm 0.9	65.9 \pm 0.6
14	65.3 \pm 1.3	66.9 \pm 0.9
	67.1 \pm 0.8	66.3 \pm 0.7
	67.5 \pm 1.5	65.8 \pm 1.2
28	67.9 \pm 0.9	68.1 \pm 1.2
	66.2 \pm 0.7	67.1 \pm 0.9
	65.6 \pm 1.3	66.4 \pm 0.7
	69.3 \pm 1.0	65.0 \pm 1.4
49	66.7 \pm 1.2	68.4 \pm 1.1
70	65.7 \pm 0.5	64.3 \pm 1.5

3.1.6 多相性終板電位 (complex e. p. p.)

20%伸張群の筋伸張側標本において、峰分かれ (notch) を示すe. p. p. (多相性終板電位, complex e. p. p.) が記録された。Complex e. p. p. が認められた代表的な神経筋接合部から、連続的に記録した100個のe. p. p. をFig. 6に示した。掃引番号27, 45, 98など

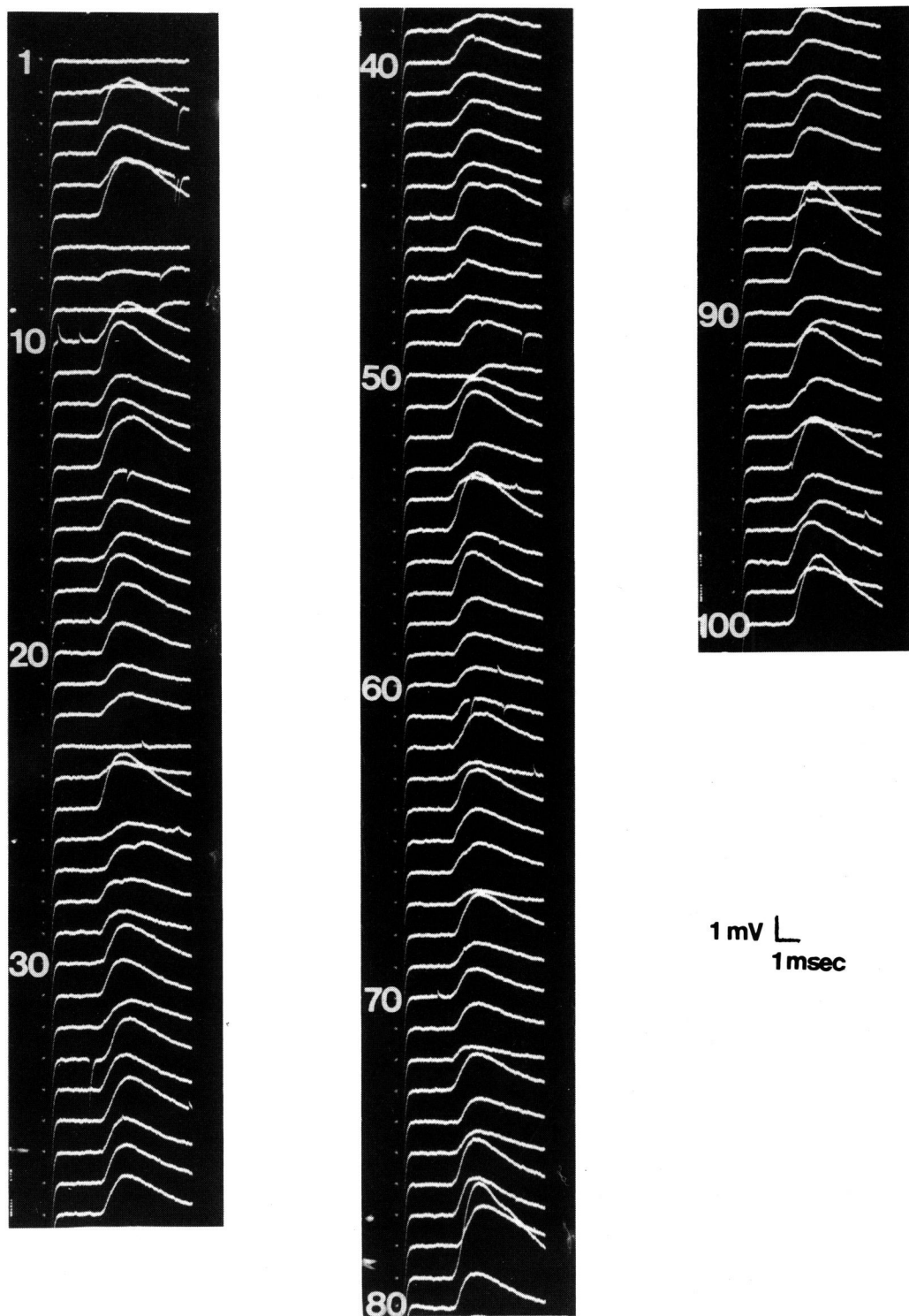


Fig. 6 Sample records of series of e.p.p. from the 20% stretched group at 14th day after the operation. Calibrations, Vertical: 1mV; Horizontal: 1 msec

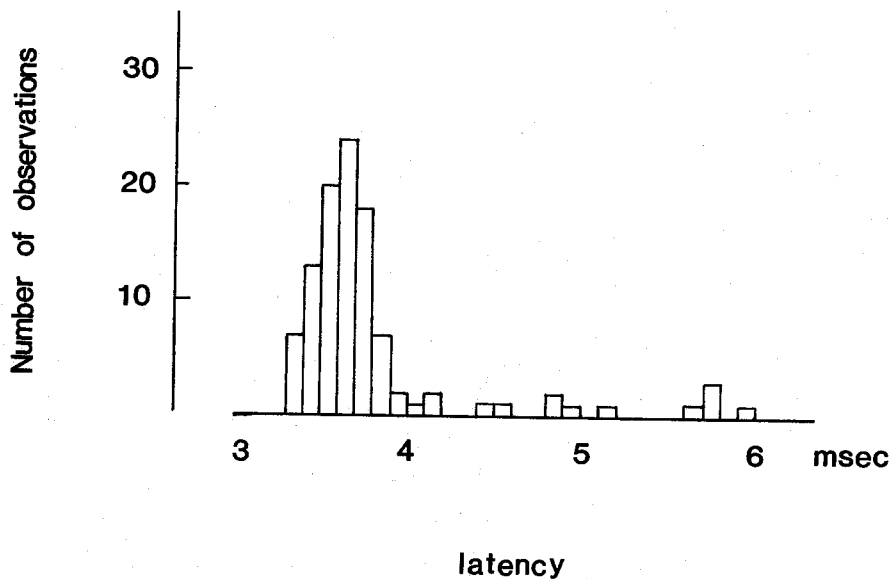


Fig. 7 Histogram of the latency of e. p. p. which was shown in Fig. 6.

は、明らかな峰分かれを示す e. p. p. であり、また、掃引番号 50 は、他のものに比べて明らかに長い潜時を示す e. p. p. である。この点をさらに明確にするために、潜時に注目して、峰分かれの部分も含め、潜時のヒストグラムを作成した (Fig. 7)。Fig. 7 より明らかなように、この神経筋接合部から記録された e. p. p. は、潜時のピークがそれぞれ 3.6 msec, 4.8 msec および 5.7 msec の付近に存在する 3 つの成分より成ることが示された。

Complex e. p. p. は、20%伸張群において、術後 14 日目では 6 個体中全個体に、術後 28 日目では 6 個体中 4 個体に認められた。Table 4 に示すように、complex e. p. p. は、術後 14 日目で 72 筋線維中 26 本に (約 36%)、術後 28 日目で 75 筋線維中 26 本に (約 34%) 観察された。これに対して、対側対照標本の観察した

142 筋線維の神経筋接合部において、complex e. p. p. は全く記録されなかった。

上述のように、complex e. p. p. の出現率は、術後 14 日目、28 日目ともに 30% を越えることが示された。成熟ラットのヒラメ筋において、約 10% の筋線維は、多重神経支配を受けている可能性が報告¹³⁾ されている。この値に比べて、本実験の成績では、complex e. p. p. の出現率は明らかに高い値を示した。したがって、筋伸張より complex e. p. p. の出現率が増加したことが推察される。

3.2 組織化学的観察

Complex e. p. p. の出現率が高い 20%伸張群の筋伸張側標本の神経筋接合部を Pestronk 法と Bodian 法を用いて組織化学的に検討した。この方法では、末梢神経線維は黒褐色に、シナプス後膜のアセチルコリンエステラーゼ活性を有する部分は透明な青色に染色され、神経支配の様式ならびに終板部の拡がりと同時に明確に観察できた。

新芽形成 (sprouting) を示している典型的な神経筋接合部を Fig. 8 A および B に示した。これらの標本では Ranvier の絞輪部から髄鞘をもたない繊細な神経の sprouting が、同一筋線維上に新しいシナプスを形成している。このことは、神経筋接合部の神経終板末端の大きさ (terminal size) が全体として拡大していることを意味している。

Table 4 Incidence of the complex e. p. p. in the 20% stretched group at various times after the operation.

Time after operation	No. of muscles examined	No. of fibers examined	% of fibers showing notch
Control	12	142	0
14 days	6	72	36
28 days	6	75	34

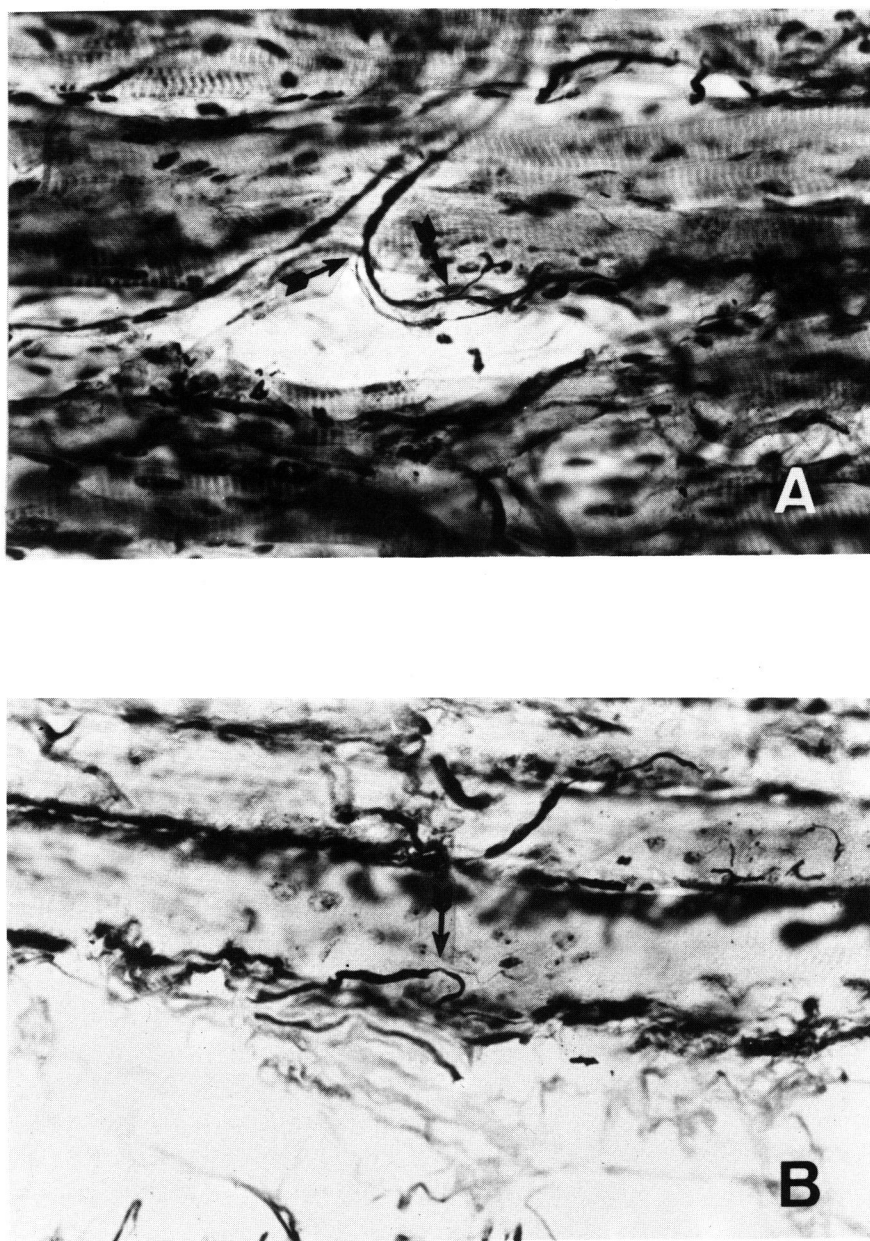


Fig. 8 Double staining for choline-esterase and peripheral nerve of soleus muscle of the 20% stretched group.
A shows the muscle stretched for 14 days.; arrows indicate nodal sprouting., $\times 40$
B shows the muscle stretched for 28 days.; arrow indicates nodal sprouting., $\times 40$

4 考 察

本実験において、シナプス前側の活動性の指標である m および $m.e.p.p.$ の頻度は、5%伸張群では有意な影響をうけなかった (Fig. 3)。10%伸張群の術後 14 日目では、筋伸張は m および $m.e.p.p.$ の頻度に有意な影響をあたえなかった。一方、28 日目では、伸張側標本の m はやや低下する傾向を示したが、 $m.e.p.p.$ の頻度は有意な影響をうけなかった (Fig. 4)。これらに対して、20%伸張群では、筋伸張は m および $m.e.p.p.$ の頻度に対し多様な影響を与え、しかもそれらは伸張期間に応じて変化することが示された (Fig. 5)。

20%伸張群において、伸張側標本の m は術後 4 日目では有意な増加を示し、この状態は術後 14 日目まで持続した。その後 m は、有意差を示さない時期を経て、漸次低下する傾向を示した。一方、 $m.e.p.p.$ の頻度は m の場合と同様に術後 4 日目は有意な増加を示したが、この状態は m の場合に比べて長く持続する傾向を示した。さらに、20%伸張群の伸張側標本では、complex e.p.p. の出現率が高く (Figs. 6 and 7, Table 4)、組織化学的に sprouting を生じていることが認められた (Fig. 8)。Slack and Hopkins¹⁴⁾ は、マウスの再神経支配筋を電気生理学的ならびに形態学的に検討し、再神経支配筋では m が増加し、このような筋では sprouting を生じていることを認めた。彼らはこれらの事実に基づいて、 m の増加は、terminal size の拡大によると推論している。同様なことは Kuno *et al.*¹⁵⁾ によって、 m および $m.e.p.p.$ の頻度は、terminal size と正の相関を示すことがカエルについて報告されている。また、メキシコサンショウウオ (axolotl) でも、quantal release parameter (n , $n = m / \text{probability of transmitter release}$) は、terminal size に依存すること¹⁶⁾ が知られている。一方、complex e.p.p. の出現は、その筋線維が複数の神経筋接合部を有することを電気生理学的に示す証拠の一つであること¹³⁾ も知られている。これらの報告を考慮すると、上述のわれわれの筋伸張により m および $m.e.p.p.$ の頻度が有意に増加した事実は、sprouting による terminal size の拡大が原因の一つであると考えられる。この考えは、筋伸張側標本において complex e.p.p. の出現率が高い事実 (Figs. 6 and 7, Table 4) および sprouting が認められた事実 (Fig. 8) により支持される。

神経筋標本において、神経に頻回刺激が与えられている期間ならびにそれを停止した後しばらくの期間は、シナプス前側の活動性が亢進すること (m , e.p.p. の

振幅ならびに $m.e.p.p.$ の頻度の増大) が知られており、これらの現象はそれぞれ presynaptic な tetanic potentiation および post-tetanic potentiation (PTP)¹⁷⁻²¹⁾ と呼ばれている。また、PTP の程度と持続時間は、刺激の頻度と期間に依存すること²¹⁾ も知られている。本実験では、ヒラメ筋に伸張を与えた状態を任意の期間維持した個体から摘出した標本を用いた。このような標本では、PTP 様の現象が発現し、それは 20%伸張群で著明になる可能性がある。つまり、われわれが用いた伸張側標本の摘出前の状態は、ヒラメ筋が伸張されたことにより伸張反射が亢進し、その結果神経筋接合部は、頻回刺激が与えられた場合と同様になっていると思われる。したがって、PTP 様の現象も 20%伸張群において m および $m.e.p.p.$ の頻度を増加させた原因の一つである可能性が示唆される。以上のように、筋伸張による m および $m.e.p.p.$ の頻度の増加は、terminal size の拡大と PTP 様の効果の主として二つの原因によると考えられる。なお、PTP 様の効果が筋伸張によるシナプス前側の活動性を亢進させる原因になるかどうかについては、筋伸張の程度と afferent nerve の発射頻度ならびにその持続時間との関係を検討する必要がある。

28 日間にわたり筋伸張を続けた場合、 $m.e.p.p.$ の頻度は有意に増加していたが、 m は有意差がないか逆に有意な低下を示した (Fig. 5)。これらの個体における complex e.p.p. の出現頻度は、 m が有意な増加を示す 14 日間筋を伸張した場合と同程度であった (Table 4)。したがって、 m の低下の原因は、前述の m の増加のそれとは異なると思われる。Otsuka *et al.*²²⁾ は、運動神経が反復刺激された時、e.p.p. の振幅が減少することを認め、これは神経終末部に貯蔵されている quantum の量が枯渇 (exhaustion) したことによると考えている。本実験のように、長期間伸張反射が亢進していたと考えられる場合は、神経終末部の quantum の貯蔵量が、伸張期間の延長とともに次第に減少することが示唆される。したがって、この quantum の貯蔵量の減少が、 m の低下をもたらしたとと思われる。なお、10%伸張群において伸張期間が長期になると、 m が低下する傾向が認められた (Fig. 4)。このことも 20%伸張群における同様に quantum の貯蔵量の減少によって起こると思われる。また、以上のように考えた場合、 m のみならず $m.e.p.p.$ の頻度もいずれは低下の方向に向かうと考えられる。したがって、 m および $m.e.p.p.$ の頻度に見られた有意差がない状態は、低下に到る一過程を示していると思われる。これらの点に関しては、筋伸張

の期間と神経終末部のシナプス小胞の数と大きさの関係を検討する必要がある。

なお、筋伸張が *m* および *m. e. p. p.* の頻度を与える影響が必ずしも一致しない、つまり *m* が対側対照に比べて有意差がないか有意な低下を示すにもかかわらず、*m. e. p. p.* の頻度が有意な増加を示す個体が認められた。Kuno *et al.*¹⁵⁾ は、*m* および *m. e. p. p.* の頻度がそれぞれ異なる要因により支配されている可能性を示唆している。このことを考慮すると、上述の *m* および *m. e. p. p.* の頻度に対する筋伸張の効果が必ずしも一致しないことは、筋伸張に対するそれぞれを支配する要因の感受性が異なることで説明されるかもしれない。

5 結 論

筋の伸張が神経筋伝達機能に及ぼす影響を与えるかを明らかにするために、シナプス前側の活動性の指標である平均素量 (*m*) および微小終板電位 (*m. e. p. p.*) の頻度に対する筋伸張の程度と伸張期間の影響をラットの脛骨神経-ヒラメ筋標本を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 5%伸張群では、筋伸張は *m* および *m. e. p. p.* の頻度に対して有意な影響を与えなかった。
2. 10%伸張群の術後 14 日目では、*m* も *m. e. p. p.* の頻度も有意な影響を受けなかったが、術後 28 日目では、*m. e. p. p.* の頻度は有意な影響を受けなかったにもかかわらず、*m* は低下する傾向があった。
3. 20%伸張群では、筋伸張は *m* および *m. e. p. p.* の頻度に対して多様な影響を与え、しかもそれらは伸張期間に応じて変化した。術後 4 日目から 14 日目まで *m* は有意な増加を示し、それ以後徐々に低下する傾向を示した。一方、*m. e. p. p.* の頻度は、*m* の場合と同様に術後 4 日目で有意な増加を示し、この状態は *m* の場合より長く持続した。
4. 20%伸張群の伸張側標本において、complex *e. p. p.* が認められ、その出現率は対側対照に比較し高かった。
5. 組織化学的に伸張側標本の神経筋接合部を検討した結果、sprouting が認められた。

以上の結果に基づいて、筋伸張によって生じたシナプス前側の活動性の変化の原因について考察した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただきました札幌医科大学生理学第 1 講座藪英世教授に深謝いたします。本研究の遂行にあたり、御教示をいただきました河邨文一郎名誉教授ならびに御指導、御校閲を

いただきました整形外科科学講座石井清一教授に深謝いたします。終始懇切なる御助言、御教示をいただきました東京医科歯科大学医学部薬理学講座宮田雄平助教授ならびに京都大学医学部生理学第 2 講座久野孝教授に深謝いたします。また、貴重な御助言をいただきました東京都神経科学総合研究所島村宗夫副所長ならびに川合述史参事に深謝いたします。本学中央組織研究室および中央写真室の各位に深謝いたします。

本論文の要旨は、第 12 回日本整形外科基礎研究会において発表した。

文 献

1. Hutter, O. F. and Trautwein, W.: Neuromuscular facilitation by stretch of motor nerve endings. *J. Physiol.* **133**, 610-625 (1956).
2. 竹内宣子: 神経筋伝達に及ぼす筋伸張の効果について。神経研究の進歩 **2**, 166-174 (1957).
3. Turkanis, S. A.: Effects of muscle stretch of transmitter release at end-plate of rat diaphragm and frog sartorius muscle. *J. Physiol.* **230**, 391-403 (1973).
4. 青木光広, 細野 惺, 太田 勲: 筋伸張による神経筋伝達の促進効果に及ぼす脚延長の影響。2. Miniature end-plate potential 並びに End-plate potential について。札幌医誌 **50**, 373-380 (1981).
5. Kawamura, B.: Limb lengthening. *Orthop. Clinic. North Am.* **9**, 155-169 (1978).
6. Capty, A. J., Kim, I. Y. and Sanders, D. B.: The neuromuscular blocking effects of therapeutic concentrations of various antibiotics on normal rat skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **217**, 369-378 (1981).
7. Fatt P. and Katz, B.: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J. Physiol.* **115**, 320-370 (1951).
8. Martin, A. R.: A further study of the statistical composition of the end-plate potential. *J. Physiol.* **130**, 114-122 (1955).
9. Ginsborg, B. L. and Jenkinson, D. H.: Neuromuscular Junction. In: Zaimis, E.: *Handbook of Experimental Pharmacology*. **42**, 229-364, Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg · New York (1976).
10. 石居 進: 生物統計学入門. 109-116, 培風館, 東京 (1975).
11. Pestronk, A. and Drachman, D. B.: A new stain for quantitative measurement of sprouting at neuromuscular junctions. *Muscle Nerve* **1**, 70-74 (1978).

12. Bodian, D.: The staining for paraffin sections of nervous tissue with activated protargol. The role of fixatives. *Anat. Rec.* **69**, 153-162 (1937).
 13. Miyata, Y. and Yoshioka, K.: Selective elimination of motor nerve terminals in the rat soleus muscle during development. *J. Physiol.* **309**, 631-646 (1980).
 14. Slack, J. R. and Hopkins, W. G.: Neuromuscular transmission at terminals of sprouted mammalian motor axons. *Brain Res.* **237**, 121-135 (1982).
 15. Kuno, M., Turkanis, S. A. and Weakly, J. N.: Correlation between nerve terminal size and transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* **213**, 545-556 (1971).
 16. Bennet, M. R. and Raftos, J.: The formation and regression of synapses during the re-innervation of axolotl striated muscles. *J. Physiol.* **265**, 261-295 (1977).
 17. Liley, A. W. and North, K. A. K.: An electrical investigation of effects of repetitive stimulation of mammalian neuromuscular junction. *J. Neurophysiol.* **16**, 509-527 (1952).
 18. Liley, A. W.: An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat. *J. Physiol.* **132**, 650-666 (1956).
 19. Brooks, V. B.: An intracellular study of the action of repetitive nerve volleys and of botulinum toxin on miniature end-plate potentials. *J. Physiol.* **134**, 264-277 (1956).
 20. Magleby, K. L. and Zengel, J. E.: Augmentation: A process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* **257**, 449-470 (1976).
 21. Lev-tov, A. and Rahamimoff, R.: A study of tetanic and post-tetanic potentiation of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* **309**, 247-273 (1980).
 22. Otsuka, M., Endo, M. and Nonomura, Y.: Presynaptic nature of neuromuscular depression. *Jpn. J. Physiol.* **12**, 573-584 (1962).
-

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学整形外科科学講座 片平弦一郎